

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1924-1925.

N° 7.

La Papaine et sa Protéolyse

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 1926.

PAR

Raymond FROSSARD

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE,

ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.

JURY { MM. GUERBET, Président.
GRIMBERT, Professeur.
LUTZ, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1926



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1924-1925.

N° 7.

La Papaine et sa Protéolyse

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 1926.

PAR

Raymond FROSSARD

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE,
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.

JURY

MM. GUERBET, Président.
GRIMBERT, Professeur.
LUTZ, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME.

1926

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, Doyen, O. *,  I.
 PERROT, Assesseur, O. *,  I.
 G. DURSENT, Secrétaire, *,  I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. *,  I.....	Botanique générale.
H. GAUTIER, O. *,  I.....	Chimie minérale.
RADAIS, O. *,  I.....	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. *,  I.....	Chimie organique.
PERROT, O. *,  I.....	Histoire Naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, *,  I.....	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut,  I.....	Physique.
GRIMBERT, *,  I.....	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *,  I.....	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. *,  I....	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, *,  I.....	Toxicologie.
BOUGAULT, *,  I.....	Chimie analytique.
N.....	Pharmacie galénique.



Doyens honoraires : MM. GUIGNARD, C. *,  I. et H. GAUTIER, O. *,  I.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. *,  I. et VILLIERS *,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, *,  I.....	Minéralogie.
Marc HONNORAT, *,  I....	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, *,  I....	Cryptogamie.
GUÉRIN, *,  I.....	Botanique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, *,  I.	MM. GUÉRIN, *,  I.	MM. GORIS, *,  I.
DAMIENS,  I.	LUTZ, *,  I.	LAUNOY, *,  I.
TASSILLY, *,  I.		HÉRISSEY, *,  I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *,  I.....	Chimie générale.
COUSIN, *,  I.....	Chimie analytique.
SOUÈGES,  I.....	Micrographie.
LEROUX,  I.....	Physique.
DEVAL,  I.....	Microbiologie.
FRANÇOIS, *,  I.....	Travaux généraux de 4 ^e année

Bibliothécaire en Chef : M. BARRAU-DIHIGO,  I.

A MES MAÎTRES DES HOPITAUX.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. LEREBoullet

MÉDECIN DE L'HÔPITAL DES ENFANTS MALADES.

Qui nous a toujours prodigué des marques de bienveillance et guidé de ses conseils.

En témoignage de respectueuse et vive gratitude.

A MONSIEUR M. FRANÇOIS,

PHARMACIEN-CHEF HONORAIRE DE L'HÔPITAL DES ENFANTS MALADES.

CHEVALIER DE LA LÉGIOn D'HONNEUR.

En témoignage de profonde reconnaissance pour la constante sympathie et les précieux conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

A MES PARENTS.

*J'offre ce travail, faible témoignage
de ma piété filiale et de ma profonde
reconnaissance pour leur abnégation
sans bornes.*

A MON FRÈRE.

En témoignage de vive affection.

A MA FAMILLE ET A MES AMIS.

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. GUERBET,

PHARMACIEN DES HÔPITAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*Hommage de profonde reconnaissance
et de respectueux attachement.*

A MON JURY DE THÈSE.

À MONSIEUR R. FABRE,

PHARMACIEN DES HÔPITAUX.

*Qui m'a inspiré ce travail, guidé de
ses conseils et donné l'amour du
travail de recherches.*

*En témoignage de respectueuse et vive
gratitude.*

HISTORIQUE.

Le Papayer commun (*Carica Papaya* L., Papayacées) est un arbre originaire des Moluques. Il s'est propagé dans l'Inde, dans l'île Maurice, aux Antilles, au Brésil et dans presque toute l'Amérique du Sud. Il y croît spontanément et n'a malheureusement pas été l'objet d'une culture méthodique. Il est désigné sous le nom de Manceiro au Brésil, de Ghamburée dans l'Inde, d'arbre à melons aux Antilles.

Le tronc atteint cinq à dix mètres de hauteur à son complet développement, avec très peu de branches. Il est couronné à son sommet par un bouquet de feuilles, ce qui lui donne quelque ressemblance avec le palmier. Les feuilles sont très amples et analogues à celles du figuier ; elles ne renferment qu'une très faible quantité de latex. Giesbrecht a retiré des feuilles un alcaloïde appelé carpaïne, qui ralentit les mouvements du cœur ; son emploi n'est pas entré dans la thérapeutique. Lorsque l'arbre est abattu, le tronc laisse exsuder abondamment un suc blanc laiteux qui se coagule spontanément à l'air.

Le fruit, ou papaye, est du volume d'un melon, ovoïde, marqué de cinq à huit côtes. D'abord verdâtre, plein de suc laiteux quand il n'est pas encore mûr, il devient ensuite jaune verdâtre et la pulpe acquiert la saveur et l'odeur de l'abricot. Il est creux comme le melon et rempli de nombreuses graines noires, de la grosseur d'un petit pois, enveloppées par une membrane ridée longitudinalement.

Le nom de *Carica Papaya* viendrait du mot « caraïbe ababai ». Les Caraïbes ont en effet longtemps employé la pulpe du fruit comme cosmétique ou comme savon. Ils lui donnaient la propriété d'enlever les taches du linge, ou les teintures des étoffes. On l'a fait également dériver du mot anglais « papaw ».

Le Papayer croît très rapidement et résiste remarquablement aux intempéries, deux qualités qui peuvent engager à en faire la culture méthodique et lucrative.

Ce qui est plus intéressant dans cette plante, c'est le latex qui est contenu dans la racine, le tronc, les feuilles et plus particulièrement dans le fruit.

On retire le suc laiteux par incision des fruits ou du tronc qui peuvent en fournir de 25 à 30 cm³ en une heure. Le procédé employé est le même que pour la récolte de l'opium qui se pratique par incision des capsules du *Papaver somniferum album*.

Depuis fort longtemps on sait que le latex dissout les matières albuminoïdes naturelles et même les substances protéiques vivantes telles que les fausses membranes diphtériques, les tissus cancéreux, etc... Dès 1750, GREFFITH HUGHES écrivait dans l'Histoire de Barbade : « Le suc du Papayer contient une matière telle que, si l'on fait bouillir le fruit vert avec la viande la plus dure, elle devient tendre en quelques minutes. » BROWNE remarquait plus tard que l'eau dans laquelle on avait fait macérer du suc de Papayer était capable d'attendrir toutes les viandes, à tel point qu'au bout de 8 à 10 minutes, elles étaient réduites en une véritable bouillie. A la Martinique, encore actuellement, les malades atteints d'ulcérations de l'estomac ont coutume de mettre dans leurs aliments des feuilles de Papayer finement hachées.

Mais les premières notions chimiques relatives au suc de Papayer sont données par VAUQUELIN [2].

En 1802, CHARPENTIER DE CORSIGNY lui apporte de l'île Maurice plusieurs échantillons de ce suc. VAUQUELIN les étudie et indique en conclusion que ce suc « se rapproche du sang, à la matière colorante près ». Il y avait trouvé une substance ressemblant à « l'albumine du sang et à la fibrine animale ».

En 1879, les travaux de WITTMACK, PECKOLT, WÜRTZ et BOUCHU rapportent ces propriétés à un ferment soluble.

D'après WITTMACK [3], le ferment du fruit de Papayer est semblable à la pepsine ; il digère les albumines, fait coaguler le lait à une température toutefois assez élevée et voisine de + 65°.

PECKOLT [4] va jusqu'à donner une analyse détaillée du suc et désigne sous le nom de « papayotine » une substance amorphe, blanc de neige, non hygroscopique, insipide, insoluble dans l'éther, l'alcool, le chloroforme, soluble dans la glycérine et l'eau. La solution aqueuse précipite par l'alcool, l'acétate de plomb, le tanin, la soude. Elle a la propriété de dissoudre les matières protéiques, mais n'attaque pas l'amidon et ne saponifie pas les graisses.

En même temps, Würrtz et Boucner [5] isolent une substance diastasique en précipitant par l'alcool du suc de Papayer spontanément coagulé. Ils donnent à cette diastase le nom de papaïne. Cette substance, disent ces auteurs, se rapproche de la pepsine par sa propriété de dissoudre la fibrine, mais en diffère parce qu'elle la dissout non seulement en présence d'une petite quantité d'acide, mais également en milieu neutre ou légèrement alcalin. Boucner [6] montre que la papaïne attaque non seulement les substances protéiques mortes, mais aussi les tissus vivants sains ou pathologiques, tissus nerveux, muscles, adénomes, cancers, fausses membranes diphtériques.

L'action stimulante du fruit vert rapé est utilisée par les cuisiniers de l'Asie et de l'Amérique centrale. Le suc le plus riche et par conséquent le plus actif se retire des fruits. Dans les pays de production, comme à Ceylan ou au Sénégal, les méthodes employées pour la récolte sont très primitives et suffisent à expliquer tant de critiques injustes ayant trait à l'emploi de la papaïne en thérapeutique et le refus de certains médecins septiques à lui accorder la valeur physiologique de la pepsine. Les Papayers ne reçoivent aucun soin, on les trouve parmi les cocotiers et les palmiers ; malgré tout ils continuent à avoir des fruits. La récolte du latex est des plus simple : elle consiste à mettre une gaine de feuilles de palmiers dans un panier très plat, à suspendre celui-ci sous les fruits verts que l'on va inciser. Le latex s'écoule goutte à goutte dans le panier, d'un débit rapide dans les premières secondes de l'incision, puis plus lentement à mesure que le latex se coagule. Celui qui se coagule sur le fruit se présente sous forme de petites larmes d'un blanc sale à odeur rappelant celle de la pepsine. Cette forme de choix convient parfaitement pour la préparation de ferment pur, mais les produits commerciaux sont souvent de qualité très inférieure. Ils proviennent du latex obtenu par la méthode dite des paniers auquel on ajoute très souvent de l'empois d'amidon de riz pour en accroître le poids et diminuer la couleur finale de la gomme. Le pourcentage de la falsification du latex des paniers varie de 10 à 80 % ; on y ajoute d'autre fois du caoutchouc, de la terre, des débris de fruits torréfiés. Ainsi travaillé, on l'étale sur des feuilles de papier et on l'expose au soleil plus ou moins longtemps pour achever sa dessiccation. Cette façon de faire est désastreuse.

Pour obtenir un produit médicinal de valeur thérapeutique

toujours comparable, il est absolument nécessaire de préparer une papaïne très pure dont l'activité protéolytique sera évaluée sur des matières albuminoïdes préalablement choisies, purifiées et dans des conditions de température, de milieu et de temps bien définies.

Nous nous sommes efforcés de compléter, en utilisant des méthodes plus précises, les recherches faites par les chimistes qui ont étudié cette question avant nous. Les questions de température optima et de réaction du milieu ont été serrées de plus près. La préparation de ferments purs à partir des sucs bruts a retenu toute notre attention. La valeur protéolytique propre ne semble pas avoir été bien étudiée et c'est là sans doute qu'il faut chercher la cause principale pour laquelle actuellement la papaïne n'est plus beaucoup employée.

Le plan de notre travail se résume donc ainsi :

- I.— Préparation et choix de matières passives.
 - Fibrine de porc (globuline).
 - Caséine (Lactoprotéide).
 - Edestine cristallisée.
- II.— Préparation de la papaïne purifiée.
 - Papaïne par précipitation alcoolique.
 - Papaïne brute dialysée.
 - Papaïne alcoolique dialysée, puis reprecipitée par l'alcool.
- III.— Mesure de l'activité protéolytique de divers sucs bruts.
 - Détermination de la température optima.
 - Détermination de la quantité optima de ferment.
 - Temps optimum.
 - Réaction du milieu et concentration en ions hydrogène la plus favorable.
- VI.— Essais à proposer et conclusions :
 - 1° Pour les sucs.
 - 2° Pour la papaïne purifiée.

Il est un devoir agréable pour nous, en terminant cette introduction d'assurer Monsieur le Professeur GUERBET de notre très vive reconnaissance pour avoir mis si aimablement à notre disposition son Laboratoire de Recherches. Il a dirigé nos travaux de ses précieux conseils et encouragé nos efforts qui auraient été

souvent été vains s'ils avaientmal guidés. Nous remercions très sincèrement M. René FABRE, Pharmacien des Hôpitaux, qui nous a suggéré les recherches que nous venons d'exposer. Il nous a guidé dans nos expérience d'une façon tout amicale pendant notre séjour à l'Hôpital Necker et donné l'amour du travail de Laboratoire par son activité infatigable.

Nous ferons part également de notre gratitude à M. PENAU qui nous a accueilli si aimablement dans son laboratoire. Cet éminent confrère, familiarisé avec l'étude des diastases, nous a été d'une très grande utilité. Nous l'assurons de toute notre reconnaissance.

I. — Les matières passives.

Les essais de ferments protéolytiques figurant au Codex 1908 se font au moyen de fibrine de porc et l'on admet indifféremment la fibrine desséchée à l'étuve à $+ 40^{\circ}$ ou la fibrine essorée. Nous nous sommes demandés s'il n'y aurait pas avantage à utiliser, pour l'essai de la papaïne, une autre matière albuminoïde. Nous avons employé, comparativement à la fibrine, successivement la caséine qui est une phosphoprotéide et l'édestine, globuline contenue dans les sémences du Chanvre (*Cannabis sativa*) que l'on peut obtenir parfaitement cristallisée, par conséquent, à un état de grande pureté.

A. — Préparation de la Fibrine.

Cette globuline forme la trame du caillot sanguin ; elle résulte de l'action d'une enzyme spéciale, la thrombine ou plasmase sur le fibrinogène. Elle est obtenue industriellement, et purifiée de la façon suivante : on prend de la fibrine fraîche de porc que l'on lave à grande eau au broyeur jusqu'à disparition complète de toute trace de sang.

On exprime légèrement, puis on fait une macération de la dite fibrine dans 2 volumes d'alcool.

Après un contact de 3 ou 4 heures, on exprime à nouveau à la presse et on soumet à la dessiccation dans le vide.

Le produit obtenu est ensuite broyé et passé au tamis n° 80. Il résulte des travaux de CHOAY [7] qu'il n'est pas indifférent d'employer de la fibrine de cheval ou celle de porc pour évaluer l'activité protéolytique d'une diastase, car le travail demandé au ferment à titrer est déjà partiellement accompli par la simple action de l'eau sur la fibrine de cheval ; il y a, en effet, autolyse partielle. Il conviendra donc de recourir exclusivement à la fibrine de porc comme le recommande le Codex 1908 pour la pepsine.

B. — La Caséine.

C'est la matière albuminoïde fondamentale du lait. Voisine des alcali-albuminés, elle s'en éloigne par le phosphore qu'elle contient dans sa molécule.

Les caséines ne se coagulent ni par la chaleur, ni par l'alcool même bouillant. Elles sont insolubles dans l'eau distillée, mais, par contre, sont solubles dans les solutions d'alcalis caustiques; l'acide acétique les précipite totalement de leurs solutions. C'est en se basant sur ces deux dernières propriétés que nous avons préparé la caséine qui a servi à nos essais protéolytiques.

Préparation. — Un litre de lait est dilué au dixième de son volume primitif avec de l'eau distillée et la caséine précipitée par addition de 1000 cm³ d'acide acétique dilué au dixième en agitant constamment. Il faut éviter toutefois un trop grand excès d'acide. Le précipité formé se dépose, la solution jaunâtre surnageante est décantée; le coagulum est ensuite lavé 3 ou 4 fois avec cinq litres d'eau distillée, jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus acides au tournesol. Le précipité est alors dissous dans une quantité suffisante de solution d'ammoniaque à 5 %, puis reprécipité par la quantité strictement nécessaire d'acide acétique dilué. Il est lavé encore une fois à l'eau, puis redissous dans la solution ammoniacale faible et, enfin, reprécipité par l'acide dilué. Ce coagulum est alors filtré sur un entonnoir à filtration rapide de BUCHNER, lavé plusieurs fois à l'eau distillée pour entraîner tout l'acide, puis mis en suspension dans un litre de solution normale d'acide chlorhydrique et agité pendant deux heures pour en séparer les sels organiques solubles. Le précipité est lavé abondamment pour éliminer tout l'acide, puis traité par de l'alcool absolu et de l'éther, et séché dans le vide phosphorique.

La caséine ainsi préparée se présente sous forme de poudre blanche à peine grise, amorphe, sa solution dans les liqueurs alcalines est lévogyre.

Cette préparation contient :

2,50 % de cendres.

15,30 % d'azote total.

L'azote total a été déterminé suivant la méthode de KJEHLDAHL modifiée par FLEURY et LEVALTIER [8]. Cette méthode consiste à

opérer à une température beaucoup plus haute que dans la méthode KJEHLDAHL. La destruction de la matière organique s'effectue au sein d'un mélange d'acide sulfurique concentré, d'acide phosphorique sirupeux et de sulfate de potasse. Le rendement est meilleur et la destruction beaucoup plus rapide qu'avec la méthode primitive de KJEHLDAHL.

C. — **Edestine.**

C'est une globuline cristallisée contenue dans les semences de certains végétaux et plus particulièrement dans les semences de chanvre [9]. Elle est douée de propriétés basiques remarquables, elle se dissout dans les solutions salines neutres avec formation d'une véritable combinaison d'édestine.

Par contre, elle est insoluble dans l'eau distillée et ses solutions salines laissent déposer de l'édestine lorsqu'elles sont diluées avec de l'eau. Si l'on extrait l'édestine au moyen d'une solution de NaCl des sels organiques et inorganiques extraits des semences, elle se combine avec eux, et si l'on dilue la solution avec de l'eau, le précipité cristallisé d'édestine obtenu ne consiste pas en une protéine seule mais dans un mélange.

C'est en se basant sur ces propriétés que nous l'avons préparée et en nous inspirant des travaux de R.-H.-A. PLUMMER [10].

Les semences de chanvre préalablement broyées au moulin à noix d'acier sont épuisées par l'éther officinal ou l'éther de pétrole, dans un soxhlet, pour les débarrasser de l'huile qu'elles contiennent. Lorsque l'éther traverse la couche de poudre sans se colorer (ce qui demande environ deux heures d'épuisement), le dégraissage peut être considéré comme suffisant. Après dessiccation à l'étuve pour se débarrasser de l'éther, la poudre est mise à macérer avec son poids de solution aqueuse de chlorure de sodium à 5 " au bain marie, à la température de $+ 60^{\circ}$ pendant une demi heure, en agitant très souvent. Le magma est passé, puis exprimé légèrement dans un nouet de gaze et le liquide clair qui s'en écoule est mis de côté. Un nouvel épuisement du résidu est nécessaire et s'effectue dans les mêmes conditions. Le liquide qui s'écoule est légèrement trouble et doit être filtré dans un entonnoir à filtration chaude à $+ 60^{\circ}$. Les deux liqueurs sont alors réunies et elles ne tardent pas à abandonner déjà par refroidissement des cristaux microscopiques d'édestine.

La précipitation s'achève en étendant la solution d'édestine de dix volumes d'eau distillée. La liqueur ainsi diluée abandonne une poudre microcristalline gris clair, qui se dépose rapidement. Celle-ci est séparée par filtration sur BUCHNER, lavée plusieurs fois à l'eau distillée, puis à l'alcool absolu, à l'éther anhydre et enfin séchée sur une plaque poreuse dans le vide phosphorique.

L'édestine se présente sous la forme d'une poudre, à cristallisation très nette au microscope.

Entièrement soluble dans le chlorure de sodium à dix pour cent, elle est précipitée de ses solutions si elles sont à nouveau étendues d'eau.

Rendement : 100 gr. de semences de chanvre donnent environ 10 gr. d'édestine.

L'analyse chimique donne :

Cendres.....	2,85 0/0
Azote total.....	13,97 0/0

II. — Préparation et choix d'une papaine active.

A. — Sucs de Papayer ou papaines brutes.

Les papaines commerciales sont loin d'être d'une égale activité. Les meilleures, titrées suivant le procédé figurant au Codex pour la pepsine, ont un pouvoir hydrolysant voisin de quatre-vingt, c'est-à-dire qu'elles peuvent hydrolyser 80 fois leur poids de fibrine sèche dans des conditions bien déterminées. Mais bien souvent les sucs de Papayer sont de moindre valeur, certains échantillons même sont dénués de toute activité. La façon souvent défectueuse de les recueillir en est, après la fraude, la principale cause. Suivant le lieu d'origine les modes d'obtention sont différents. Les meilleures sortes sont obtenues en faisant sécher les petites larmes qui s'écoulent du fruit incisé, d'abord au soleil, puis au four à une température voisine de 50°. Le suc se présente alors sous forme de petites larmes irrégulières, d'un blanc jaunâtre, parfois un peu plus rougeâtre, possédant une odeur animalisée qui n'a rien de désagréable. C'est la sorte de choix, assez rare, d'un prix élevé par conséquent et difficile à se procurer.

Les sortes plus ordinaires qui arrivent sur nos marchés sont de qualité plus inférieure, en petites masses gris sale ou en poudre grossière à odeur forte parfois très désagréable. Celles-ci sont obtenues soit par écrasement et expression du fruit en présence d'eau pour obtenir un rendement meilleur, soit par épuisement du latex obtenu par la méthode dite des paniers. Il se forme un dépôt boueux, on décante le liquide visqueux surnageant, on l'étale et sèche rapidement car il est très putrescible. Ce mode de préparation est très défectueux et pour peu que la drogue ait subi un commencement de putréfaction toute activité diastasique a disparu.

Le produit commercial qui nous a servi est du latex de fruit concrété en larmes, séché au soleil, puis au four à température

modérée. Il a été pulvérisé et se présente sous forme d'une poudre fine gris clair, avec quelques particules brun rougeâtre, il possède une odeur faible rappelant celle de la pepsine.

Incomplètement soluble dans l'eau, ce suc donne un résidu blanc, amorphe, qui se dépose lentement. Ce résidu ne donne pas les réactions de l'amidon, dont l'addition frauduleuse a été signalée; il ne se dissout pas dans les acides minéraux, se colore en brun noirâtre au contact de l'acide sulfurique et laisse à la calcination un charbon fin et très poreux. C'est probablement une résine.

Cette poudre de suc de Papayer donne à l'analyse :

4,99	%	de cendres
5,5	%	d'eau à + 100°
12,2	%	d'azote total

Nous avons analysé d'autres suc bruts, les uns peu colorés à odeur faible de diastase, les autres plus colorés et possédant une odeur forte, désagréable. Voici les résultats de nos analyses :

Suc n° 1.— Couleur paille, odeur faible :

Eau à + 100°	24,05	%
Cendres	5,95	—
Azote total	12,9	—

Suc n° 2.— Brun clair, odeur faible :

Eau à + 100°	20,64	%
Cendres	6,37	—
Azote total	12,2	—

Suc n° 3.— Brun clair, odeur forte mais non désagréable :

Eau à + 100°	24,56	%
Cendres	8,23	—
Azote total	19,9	—

Suc n° 4.— Suc brun rougeâtre foncé, odeur forte, désagréable :

Eau à + 100°	20,96	%
Cendres	10,66	—
Azote total	7,2	—

La valeur protéolytique de ces divers suc décroît, ainsi que nous le verrons, à mesure que leur couleur et que leur odeur s'accroissent. Il semble que les échantillons les plus colorés ont déjà subi un commencement de putréfaction ou tout au moins une profonde altération. Il nous a paru nécessaire de chercher une méthode de purification des suc donnant à la fois une papaine active et un rendement quantitatif suffisant. Nous allons étudier successivement dans leurs détails différents modes de purification.

B. — Suc de Papayer purifié par simple précipitation alcoolique.

La méthode la plus simple et la plus généralement employée pour purifier une diastase consiste à précipiter celle-ci de sa solution aqueuse par un volume cinq à dix fois supérieur d'alcool à 95°. Mais il faut avoir soin de réduire au minimum le temps de contact du ferment avec l'alcool, qui exerce, comme nous avons pu le vérifier, une action destructive certaine sur le ferment, par contact prolongé. Au cours de nos essais, nous avons pu nous rendre compte qu'après 6 heures de contact l'activité du ferment est déjà diminuée du tiers de son activité primitive. Après trois jours, le ferment protéolytique est complètement détruit.

Mode opératoire. — 25 grammes de suc de Papayer décrit précédemment sont épuisés avec un litre d'eau distillée en faisant quatre macérations successives avec chaque fois 250 cm³ d'eau. Les solutions sont réunies et concentrées dans le vide à une température à + 30°, jusqu'au volume de 300 cm³. Il faut opérer en faisant arriver la liqueur goutte à goutte dans le ballon pour ne pas être gêné par une mousse trop abondante. La liqueur ainsi concentrée est précipitée par 5 volumes d'alcool à 95°. Un abondant précipité se forme, il est rapidement séparé par centrifugation.

Après s'être assuré que la liqueur alcoolique surnageante ne précipite plus par addition d'alcool ou d'éther, le précipité est lavé rapidement d'abord à l'alcool absolu, puis à l'éther anhydre. Étalé en couche mince sur une plaque poreuse, il est desséché dans le vide en présence de ponce phosphorique.

Le produit obtenu est une poudre gris clair, à peine plus coloré que le suc dont nous étions parti. Le rendement est de 20,5 %.

Cette papaine purifiée est soluble dans dix volumes d'eau à + 20°, sans résidu et la solution aqueuse mousse encore très abondamment. L'analyse chimique donne :

Cendres.....	4	0/0
Azote total.....	15,6	—

C. **Suc de Papayer purifié par dialyse,
puis précipité par l'alcool.**

La dialyse des matières protéiques permet de les priver des sels minéraux qui les accompagnent. Elle peut être effectuée très facilement au moyen d'un sac de collodion lorsqu'on opère sur de petites quantités. L'industrie utilise des membranes qui permettent de dialyser plusieurs litres de liquide à la fois. Si on a soin de faire arriver un très faible courant d'azote dans le liquide dialysé, en active encore l'opération.

Ce courant d'azote que l'on fait arriver au $1/3$ inférieur du liquide à dialyser a pour but de changer à tout moment les surfaces de contact du liquide avec la membrane semiperméable. On utilise un tube d'azote sous pression auquel on adapte un tube de caoutchouc muni d'une ampoule de verre percée de petits trous. Le courant gazeux agit mécaniquement à la façon d'un agitateur. De sorte que cette manipulation, qui de prime abord paraît difficile est dans sa réalisation beaucoup plus simple.

Nous avons pu, en faisant une dialyse de huit heures, obtenir une papaine qui ne contenait plus qu'une très faible quantité de sels minéraux.

Mode opératoire. — 25 grammes de suc de Papayer sont épuisés par un litre d'eau bidistillée, en faisant 4 macérations successives comme précédemment. Les liqueurs d'épuisement sont réunies concentrées dans le vide à 300 cm^3 et soumises à la dialyse contre deux litres d'eau distillée pendant huit heures. L'eau de dialyse est renouvelée toutes les deux heures. Les dialysats successifs ont été soumis à l'analyse.

Pendant toutes nos manipulations, nous avons eu soin d'opérer sous une petite couche de toluène, pour éviter toute putréfaction de notre suc.

Voir les résultats de l'analyse des eaux de dialyse (p. 14).

Le soluté de papaine dialysé est concentré à 200 cm^3 par distillation dans le vide à $+30^\circ$. Le ferment précipité par addition de cinq volumes d'alcool à 95° est recueilli par centrifugation électrique, lavé à l'alcool absolu puis à l'éther anhydre et enfin desséché dans le vide sur ponce phosphorique.

	Temps	Extrait %	Extrait pour 2 litres	Cendres %	Cendres pour 2 litres
1 ^{re} eau. .	10 h. à 12 h. (2 h.)	0,15	3	0,034	0,68
2 ^e — ...	12 h. à 14 h. —	0,14	2,80	0,032	0,64
3 ^e — ...	14 h. à 16 h. —	0,10	2	0,028	0,56
4 ^e — ...	16 h. à 18 h. —	0,055	1,10	0,012	0,24

Le produit obtenu à l'aspect d'une poudre d'un blanc grisâtre légèrement plus coloré que la papaïne obtenue par simple précipitation alcoolique.

Il donne à l'analyse les résultats suivants :

Humidité.....	0,65 % à + 100°
Cendres.....	3,12 —
Azote total.....	19 — (méthode KJEHLDAHL modifiée par FLEURY-LEVALTIER).

Le rendement est de 18,5 " du suc brut de Papayer dont nous sommes partis.

D. — **Papaïne précipitée par l'alcool, dialysée puis reprécipitée par l'alcool.**

Les deux modes de purification du suc brut de Papayer que nous venons de décrire, soit par précipitation par l'alcool à 95°, soit par dialyse sous toluène, permettent d'obtenir un ferment déjà suffisamment actif. Nous nous sommes demandés, s'il n'y aurait pas avantage à employer simultanément la précipitation alcoolique et la dialyse. Les résultats que nous avons obtenus semblent avoir satisfait nos espérances.

Mode opératoire. — 10 grammes de suc de Papayer sont purifiés suivant la technique décrite au paragraphe B; mais le précipité, au lieu d'être desséché dans le vide, est redissous dans dix volumes d'eau bidistillée et soumis à la dialyse sous toluène, dans un sac de collodion pendant 36 heures, contre vingt litres d'eau glacée, en

ayant soin comme précédemment de faire arriver un léger courant d'azote dans le liquide à dialyser.

La liqueur dialysée est alors concentrée au tiers de son volume primitif dans le vide à une température voisine de $+ 30^{\circ}$. Le ferment en est reprecipité par cinq volumes d'alcool à 95° , puis lavé et séché comme précédemment.

Le produit se présente sous forme de lamelles légèrement brunâtres, presque inodores et très friables. Elles sont solubles dans dix volumes d'eau en donnant une solution très peu colorée et moussant très abondamment par agitation.

L'analyse chimique fournit les résultats suivants :

Humidité.....	0,60 %
Cendres	2,45 —
Azote total	18,2 —

(Méthode KJEHLDAHL modifiée par FLEURY-LEVALTIER).

Le rendement a atteint 10,5 % de suc de Papayer.

III. — Mesure de l'activité protéolytique.

L'activité protéolytique de la papaine fut longtemps contestée. C'est que l'hydrolyse des matières albuminoïdes par ce ferment est toujours précédé à la température ordinaire d'un phénomène de dissolution brusque. Cette liquéfaction est surtout très apparente lorsque la matière passive est de l'ovalbumine. Henri MOUTON et POZERSKI [11] décrivent le phénomène avec beaucoup de détails. Ils ajoutent à 2 cm³ d'albumine d'œuf, 1 cm³ de solution de papaine à 2 % et portent le mélange immédiatement dans un viscosimètre d'OSTWALD à + 24°. Le liquide s'écoule en 22 secondes, alors que la même albumine additionnée de 1 cm³ d'eau physiologique s'écoule en 92 secondes.

Il y a donc eu liquéfaction brusque de l'ovalbumine sous l'action de la papaine. D'après ces auteurs, cette liquéfaction ne produit jamais ni albumoses, ni peptones, ni acides aminés. Il en est tout autrement si, au lieu d'opérer à la température ordinaire, le mélange est porté seulement quelques secondes à une température de + 70 à + 80°. Il se produit, dans ces nouvelles conditions, une hydrolyse profonde avec formation abondante de peptones. L'action digestive de la papaine arrive très rapidement au terme de peptone et cela beaucoup plus vite qu'avec la pepsine. L'hydrolyse semble aussi beaucoup plus profonde, on aboutit promptement au tryptophane et nous avons confirmé les résultats de ces auteurs en caractérisant le tryptophane dans tous nos liquides de digestion par la belle coloration rouge qu'il donne avec l'eau de brome.

Dans les phénomènes de digestion brusque, l'hydrolyse s'arrête toujours au stade peptone, sans qu'il se forme jamais d'acides. Au contraire, avec des digestions plus prolongées et surtout à une température voisine de + 70°, on obtient des acides libres.

Divers acides ont été identifiés dans les liquides de digestion prolongée, ce sont : le glycocole, l'alanine, l'acide amino-valéria-

nique, l'acide aspartique, la leucine, la tyrosine, l'arginine (EMMERLING [12]) et l'histidine, la lysine, et le tryptophane (KUTSCHER et LOHMANN [13]). La digestion papainique de longue durée se rapproche de la digestion pancréatique. L'eau de brome donne avec les produits de digestion papainique une coloration rose, puis rouge violacée qui rappelle, quoique plus faible, la coloration que donne dans les mêmes circonstances les produits de digestion pancréatique. Elle est due au tryptophane.

Nous ne nous occuperons pas du phénomène de liquéfaction à la température ordinaire qui a été étudié et décrit longuement par H. MOUTON et POZERSKI. C'est la protéolyse elle-même qui retiendra notre attention. Nous allons examiner successivement quelles sont les conditions de température, de concentration en ferment, de temps et de réaction du milieu les plus favorables à cette protéolyse.

Pour évaluer l'activité protéolytique des ferments que nous avons préparés et le degré de dégradation des matières albuminoïdes, nous avons cherché des méthodes simples et pratiques, donnant avant tout des résultats comparables. A cet effet, nous avons suivi la méthode qui figure au Codex 1908, pour l'essai d'une digestion pancréatique sur les matières protéiques, en ayant soin toutefois d'opérer dans une fiole d'ERLENMEYER de 120 cm³ en verre neutre que nous avons placée dans un bain marie contenant environ 10 litres d'eau, de façon à avoir une température toujours bien constante. Dans le liquide de chaque fiole d'ERLENMEYER plongeait un thermomètre qui nous indiquait à chaque instant la température du milieu.

A chaque opération, nous avons fait trois expériences, les résultats que nous consignons en sont la moyenne.

Les quantités respectives des corps mis en œuvre ont été pour chaque essai :

Matières protéiques.....	2 gr.,50
Ferment.....	q. v.
Eau distillée.....	50 cm ³

Nous nous sommes inspirés des travaux de CHOAY sur les extraits opothérapiques pour mesurer l'activité protéolytiques de nos papaines.

Après chaque digestion, nous avons fait des prélèvements de liquide filtré pour déterminer :

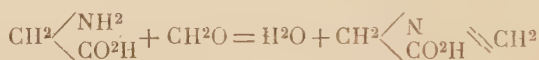
1° La déviation polarimétrique. Elle s'effectue dans un tube de vingt cm., sans défécation préalable, les liquides de digestion

papaïnique étant suffisamment clairs, après filtration sur BERZELIUS. Cette déviation permet de faire le calcul du pouvoir rotatoire.

2° Les proportions de substances solubilisées d'après l'extrait sec obtenu sur une prise d'essai de 10 cm³ de liquide de digestion, après un séjour de six heures à l'étuve à + 100°.

3° La quantité d'acides aminés formés au moyen de la méthode dite au formol, préconisée par divers auteurs, en particulier, par SOERENSEN [14].

Basée sur une observation de SCHEFF, cette méthode permet de déterminer le degré d'hydrolyse d'une matière protéique. Si l'on ajoute du formol neutre à une solution d'acides aminés neutre elle aussi, le formol bloque la fonction basique et l'on constate que cette solution devient immédiatement acide. Soit, par exemple, du glycolle, on a :



La mesure de cette acidité indiquera donc la quantité d'acides aminés contenue dans une solution.

Un phénomène identique se passe dans la protéolyse. La molécule des substances protéiques est constituée par des radicaux divers unis par les liaisons -CO-N. Ainsi, à chaque étape de dégradation, l'hydrolyse fixe les éléments de l'eau sur une des liaisons, la chaîne s'ouvre, il y a production d'une fonction acide. Soit, par exemple, une dipeptide : la glycylglycine.

CH²-(NH²)-CO-NH-CH²-COOH par fixation de H²O, elle donne 2 molécules de glycolle CH²(NH²)COOH.

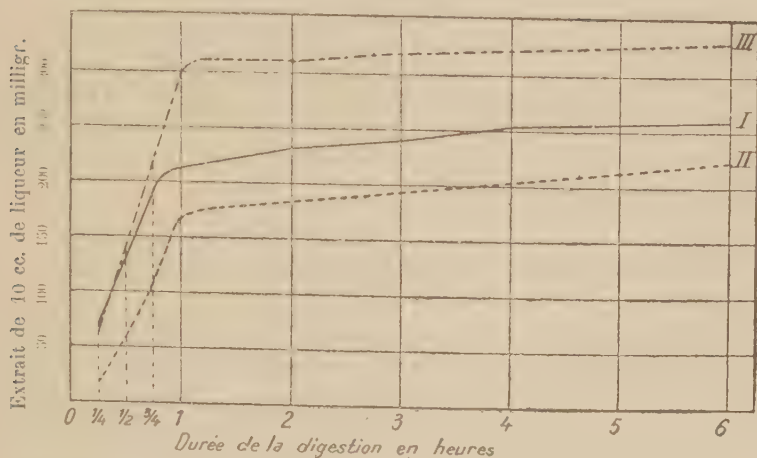
Plus les produits de dégradation renfermeront de groupes CO²H, plus cette dégradation sera avancée, et, par conséquent, plus la molécule sera petite. Mais en même temps qu'un groupement CO²H apparaît, il se forme un groupement basique NH². Il y a équilibre entre ces 2 fonctions et la réaction du milieu n'est pas changée. Dès que l'on ajoute dans la liqueur du formol neutre, le liquide devient acide comme nous l'avons vu. C'est en dosant cette acidité, au moyen d'une solution titrée de NaOH, que l'on évalue le degré de la protéolyse des matières albuminoïdes.

Méthodes de titrage au formol employées :

Solutions : 1° Solution alcoolique de phénol-phtaléine à 0,50 p. 100.

2° Solution de formol à 40 p. 100 exactement neutralisé par NaOH décimale en présence de solution de phénol-phthaléine ajoutée au moment de l'emploi.

3^e Solution de soude pure décimale, c'est-à-dire à 4 gr. de NaOH pour 1.000 cm³ d'eau distillée.



GRAPHIQUE 1. — Courbe en fonction de la concentration du milieu en ions H (Réaction du milieu).

Mode opératoire. — 10 cm³ exactement mesurés à la pipette, de liqueur de digestion sont placés dans une fiole conique en verre neutre et additionnés de 0 cm³,2 de solution alcoolique de phénol-phtaléine. On verse alors à l'aide d'une burette et goutte à goutte la solution de soude décimale, jusqu'à coloration rose pâle (opérer pour avoir toujours la même teinte en présence d'un témoin). On verse alors dans la liqueur 5 cm³ de formol neutre. Aussitôt, la teinte rose disparaît, on agite et après une à deux minutes de repos, on titre acidimétriquement. Lorsqu'on opère avec de l'eau distillée, il y a lieu de faire une correction, car le virage n'est pas immédiat à cause des faibles quantités de CO² dissous; mais nous étant servi pendant toutes nos recherches d'eau bidistillée de pH 6,85, il n'y a pas eu lieu de faire cette correction. Cette eau ne contient plus aucune trace de CO² capable de troubler les résultats. Cette méthode donne de bons résultats pour l'estimation de l'azote contenu dans les différents amino-acides : glycocolle, alanine, leucine, acide aspartique, ornithine, lysine, serine, histidine, asparagine, comme l'ont montré VAN SLYKE et SOERENSEN, ils ont constaté, par contre, que de nombreux acides aminés ne sont pas justiciables de cette méthode, avec la tyrosine, par exemple, on trouve sensiblement plus d'azote que le calcul ne l'indique.

4^e La touche azotique qui consiste à ajouter 20 gouttes d'acide

azotique officinal à 10 cm³ de liquide de digestion. Il ne doit se former ni trouble, ni précipité qui indiqueraient la présence de matières albuminoïdes non dégradées.

Conclusion. — Il nous a semblé que ces méthodes d'analyses utilisées simultanément traduisent le travail fermentaire en fonction du pouvoir dissolvant, d'une part, et du pouvoir dégradant, d'autre part. Elles donnent des résultats très concordants comme le montre le Tableau comparatif de ces méthodes.

Détermination de la température optima.

L'étude des conditions de température de la digestion papainique semble n'avoir pas été l'objet de recherches conduites avec tout le soin et tout l'intérêt qu'elles présentaient. Les expérimentateurs, ayant effectué leurs essais de digestion à des températures comprises entre 35° et 50°, arrivèrent à des résultats contradictoires : ainsi RIDEAL [15] dit que la température la plus favorable est 50°. ROSSBACH [16] se limite à des températures comprises entre + 10° et + 38° et conclut que son activité est la même à froid qu'à + 38°. S. MARTIN [17] n'est pas du même avis et établit qu'elle agit mieux à + 36° qu'à + 19°. WITTMACH [18] est plus près de la réalité et affirme qu'elle a son maximum d'activité à + 60-65°. Il faut arriver aux observations de DELEZENNE [19], MOUTON et POZERSKI pour avoir des notions nouvelles fort intéressantes. Leurs expériences apportent un fait nouveau et montrent nettement que l'optimum d'action de la papaine est placée à une température plus haute que pour tout autre ferment soluble. Il est compris entre + 80° et 90° et plus voisin de + 80°.

Leurs expériences ont porté sur la digestion de l'ovalbumine, d'une part, et du sérum sanguin, d'autre part. Il semble que les expérimentateurs ont déjà entrevu que les températures optima respectives pour ces 2 matières albuminoïdes ne sont pas semblables : aussi disent-ils que la température optima est comprise entre 80° et 90°, plus voisine de 80°. Nous allons voir que cette température optima varie également avec la nature de notre matière passive. Si elle est de 90° pour la caséine, elle n'est plus que de 70° pour la fibrine et l'édestine.

Les résultats de nos expériences sont les suivants :

1° Protéolyse de la fibrine.

Températures	Déviation polarimétrique Dév. initiale = 0°,32' 1 = 2	Acides aminés Méthode SØRENSEN Sol. NaOH décimale	Extrait sec de 10 cm ³ de liquide de digestion
		cm ³	gr.
90	— 2°,52'	1,60	0,172
80	— 3°,44'	2,4	0,241
75	— 3°,48'	2,5	0,248
70	— 3°,52'	2,6	0,251
60	— 3°,06'	2,4	0,226
50	— 2°,58'	2,4	0,176
40	— 2°,32'	2,3	0,163
30	— 1°,58'	2,3	1,156

(Température optimum = + 7°).

2° Protéolyse de l'édestine.

	Dév. initiale = 0°,16'		
80	— 1°,32'	1,3	0,152
75	— 1°,32'	1,5	0,178
70	— 1°,30'	2,0	0,203
60	— 1°,28'	1,6	0,199
50	— 1°,08'	1,05	0,153
40	— 1°,02'	0,8	0,141
30	— 0°,72'	0,4	0,126

(Température optimum = + 70°).

3° Protéolyse de la caséine.

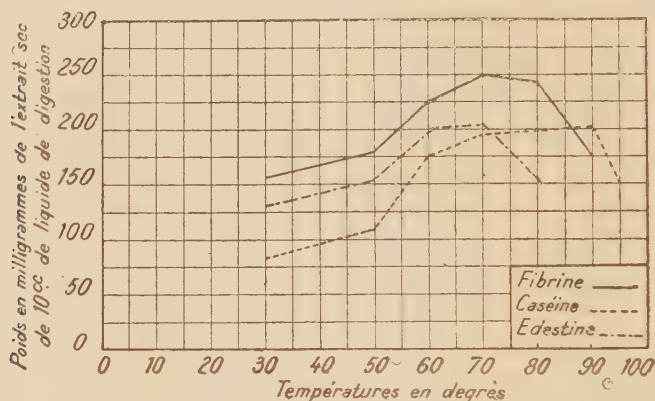
	Dév. initiale = 0°,28'		
95	— 1°,42'	0,95	0,150
90	— 3°,52'	2,0	0,203
80	— 3°,50'	1,9	0,198
70	— 3°,44'	1,8	0,190
60	— 3°,22'	1,6	0,175
50	— 1°,58'	0,8	0,104
40	— 1°,30'	0,4	0,095
30	— 1°,16'	0,3	0,078

(Température optimum = + 90°).

Nous avons opéré chaque fois dans les mêmes conditions, c'est-à-dire :

2 gr.,50 de matière albuminoïde
0 gr.,10 de papaïne précipitée par l'alcool
50 cm³ d'eau bidistillée (pH = 6,87)

Temps de digestion = 3 heures (Cette durée de 3 heures n'a pas été prise arbitrairement, elle résulte des expériences du parag. IV).



GRAPHIQUE 2. — Courbe de température optimum.

Ces expériences montrent très nettement l'influence de la température sur la marche de la protéolyse papainique. Mais ce qui frappe surtout, lorsqu'on compare une digestion pepsique ou pancréatique à une protéolyse papainique, c'est de voir que l'optimum de température de celle-ci est beaucoup plus élevé que pour les autres ferments solubles. Cette différence devient tout à fait nette lorsque l'on opère sur de la caséine où la digestion *in vitro* atteint son maximum à + 90°. Il semble qu'à cette température, la caséine subisse en dehors de toute action fermentaire une sorte de transformation qui la rend plus facilement attaquable par le ferment protéolytique. Ceci expliquerait qu'à cette température, son hydrolyse devienne plus profonde. D'un autre côté à + 95°, l'hydrolyse est très fortement diminuée puisqu'elle n'est plus guère comparable qu'à celle produite à + 45°; une différence de quelques degrés suffit pour modifier toute la marche de la dégradation de la matière protéique passive et l'on peut dire que l'optimum de température est très voisin de la température suffisante pour tuer l'enzyme, fait que l'on pourrait comparer à l'action physiologique et thérapeutique de certains poisons qui ont leur maximum d'action très voisin de leur toxicité.

Conclusion. — La température optima pour la fibrine et l'edestine est de + 70°, elle est de + 90° pour la caséine.

Influence de la quantité de ferment.

Les proportions entre la quantité de diastase qu'il faut mettre en œuvre et la quantité de matière passive ou substrat à hydrolyser ont été et sont encore fort discutés.

J. KJELDAHL [20] semble s'être l'un des premiers occupé de cette question dans son ouvrage « Recherche sur les ferments producteurs de sucre ». Il constate que pour certaines proportions la quantité de sucre produite est directement proportionnelle à la quantité de ferment qui entre dans la réaction. Dans ces conditions, si l'on prend comme variables les proportions de ferment, d'une part, et celles de matières à transformer, d'autre part, on constate que « la courbe est presque une droite ». L'énoncé de ce rapport porte le nom de « loi de KJELDAHL ». Cet auteur a vu également que si les proportions grandissent « la courbe s'infléchit de plus en plus et que la production de sucre croît beaucoup moins rapidement que la diastase ».

H. COLIN et Mlle A. CHAUDUN [21], à propos de la sucrase, ont mis ce phénomène en évidence. Ils émettent l'hypothèse d'une combinaison du ferment avec la matière passive, combinaison très instable qui se décomposerait au contact de l'eau avec une vitesse définie pour donner du sucre interverti et le ferment.

FLEURY a confirmé cette hypothèse du substrat-ferment dans son étude de l'action de la laccase sur le gaïacol. H. COLIN et Mlle CHAUDUN énoncent ainsi cette action :

1^{re} loi. — La diastase est en excès par rapport à la matière passive :
« ... La vitesse d'action est alors indépendante de la quantité du catalyseur ».

2^e loi. — La matière passive est en excès par rapport à la diastase.
« ... La vitesse d'action croît quand on augmente la quantité du catalyseur ».

Le Codex donne pour la pepsine la proportion de 0,10 de ferment pour 2,50 de fibrine et pour la pancréatine 0,20 pour 2,50 de fibrine. Nous avons employé avec notre papaine des quantités de ferment variant de 0 gr.,30 à 0 gr.,025.

Conditions d'expérience :

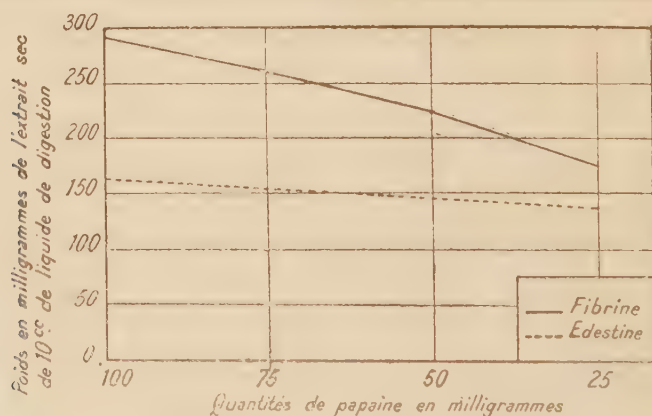
Matières protéiques.....	2,50
Ferment.....	q. v.
Eau bidistillée.....	50
Temps.....	3 heures
Température.....	+ 70°

REMARQUE. — Chaque chiffre est la moyenne des trois expériences faites dans des conditions identiques.

Voici les résultats :

1) Papaine en mgr.	Fibrine	Déviati on polarimétrique	Acides aminés NaOH décimale	Extrait sec de 10 cm ³ de liq.
				gr.
0,025	2,50	— 3°,02'	1,8	0,168
0,050	»	— 4°,04'	2,1	0,232
0,075	»	— 4°,30'	2,8	0,269
0,100	»	— 4°,58'	3,3	0,312
0,200	»	— 4°,26'	3,4	0,322
0,300	»	— 5°,34'	3,45	0,328

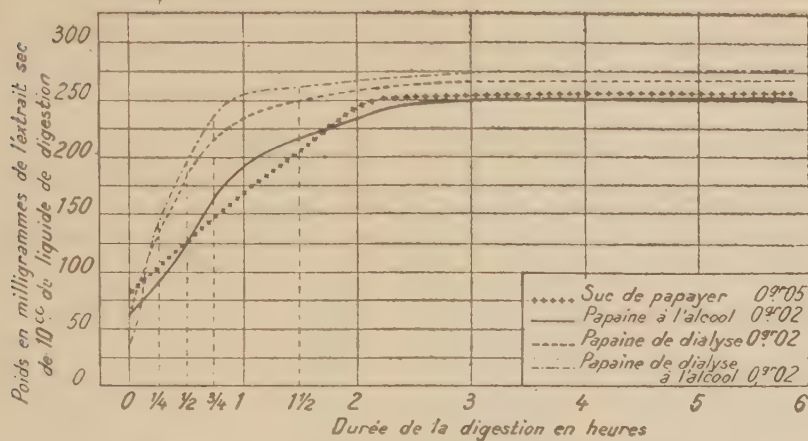
2) Papaine	Edestine	Dév. polar.	Ac. am.	Extrait sec
0,025	2,50	— 0°,80'	0,45	0,130
0,050	»	— 1°,10'	0,95	0,145
0,075	»	— 1°,28'	1,3	0,160
0,100	»	— 1°,32'	1,5	0,168
0,200	»	— 1°,42'	1,65	0,170
0,300	»	— 1°,50'	1,7	0,171



GRAPHIQUE 3. — Courbe en fonction de petites quantités de ferment.

Ce qui frappe tout de suite l'attention dans les chiffres et dans les courbes, c'est qu'une quantité double de papaine ne donne pas une quantité double de produits solubles provenant de la dégradation

des matières protéiques. L'augmentation, qui est considérable tout au moins avec la fibrine, matière protéique plus facilement attaquable par le ferment que l'édésine, lorsque l'on passe des quantités 0,025 à 0,100, diminue progressivement pour être presque nulle entre 0,200 et 0,300.



GRAPHIQUE 4. — Courbe en fonction de la quantité de ferment.

P. FLEURY [22] fait remarquer qu'en réalité le problème se pose d'une façon plus complexe. En se plaçant dans le cas précédent, c'est-à-dire dans des conditions telles que la transformation suive une courbe logarithmique, nous sommes au-dessous de la concentration critique en matière passive et la quantité de matière transformée par une quantité double de ferment ne peut se maintenir en proportionnalité linéaire puisque la quantité restante diminue plus vite. C'est pourquoi plus la transformation sera avancée, plus la différence constatée entre deux expériences sera faible.

En résumé, lorsque les réactions sont logarithmiques, il ne peut y avoir de proportionnalité entre les quantités de ferment et les quantités de matières transformées et cette discordance est d'autant plus marquée que le stade de la réaction est plus avancé.

Variation d'activité en fonction du temps pour diverses quantités de papaine.

Si on examine pour de petites quantités de papaine la courbe qui traduit la variation d'activité en fonction du temps, on constate que ce n'est pas une droite. On y distingue nettement 2 parties comme le montre la figure.

Conditions expérimentales :

1° Avec 0,05 de papaïne précipitée par l'alcool et dialysée toutes les autres conditions, de concentration, de température, étant les mêmes, soit :

Matières passives.....	= 2,50
Volume eau distillée.....	= 50 cm ³
Température.....	= + 70°

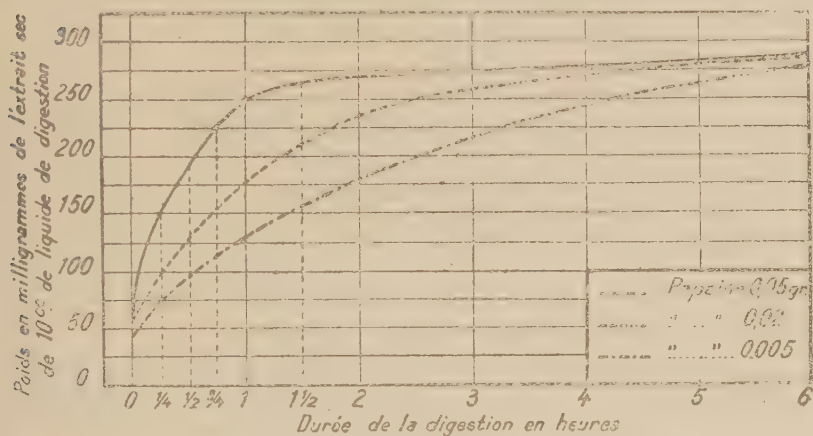
Les résultats obtenus sont :

Temps en heures	Déviati on polarimétrique (1 = 2 d. c. m.)	Acides aminés Méthode SOERENSEN NaOH décínormal	Extrait sec sur 10 cm ³ de liq. de digestion
			gr.
1/4	— 2°, 12'	0.45	0.160
1/2	— 2°, 54'	0.60	0.200
1.3	— 3°, 36'	1.60	0.238
1	— 3°, 50'	1.95	0.252
1 1.2	— 4°, 12'	2.10	0.263
2	— 4°, 24'	2.20	0.262
3	— 4°, 36'	2.30	0.274
4	— 4°, 42'	2.34	0.278
5	— 4°, 50'	2.4	0.280
6	— 4°, 52'	2.55	0.291
<i>2° Avec 0,02 de la même papaïne :</i>			
1/4	— 0°, 58'	0.25	0.098
1/2	— 1°, 12'	0.30	0.139
3/4	— 1°, 30'	0.40	0.167
1	— 1°, 54'	0.45	0.188
1 1.2	— 2°, 12'	0.50	0.221
2	— 2°, 36'	0.85	0.242
3	— 2°, 44'	1.10	0.267
4	— 2°, 58'	1.75	0.273
5	— 3°, 10'	1.90	0.284
6	— 3°, 24'	2.15	0.286
<i>3° Avec 0,005 de la même papaïne :</i>			
1/4	— 0°, 32'	0.20	0.076
1/2	— 0°, 44'	0.30	0.098
1.3	— 0°, 56'	0.30	0.113
1	— 1°, 04'	0.35	0.129
1 1.2	— 1°, 12'	0.35	0.154
2	— 1°, 20'	0.45	0.177
3	— 1°, 42'	0.60	0.220
4	— 1°, 56'	0.85	0.247
5	— 2°, 15'	1.15	0.265
6	— 2°, 28'	1.20	0.276

Les deux parties que montre le graphique sont ainsi :

1° Une partie qui correspond à la période de mise en marche d'établissement de la réaction et qui est sensiblement logarithmique. Elle est d'autant plus prolongée que la quantité de papaine mise en œuvre est plus petite.

2° Une autre partie qui correspond à la période d'action normale ou période de constance pendant laquelle la quantité d'acides aminés formés est sensiblement proportionnelle au temps.



GRAPHIQUE 5. — Courbes en fonction du temps.

Conclusion. — La quantité de papaine donnant la protéolyse la plus régulière et la plus complète est de 0,02 de ferment purifié par dialyse et précipitation par l'alcool en utilisant 2,50 de fibrine comme matière passive. Elle correspond à 0,10 de papaine purifiée par simple précipitation alcoolique. Il faut donc employer ces concentrations pour faire les essais protéolytiques dans les meilleures conditions.

Matières transformées en fonction du temps. Temps optimum.

Si, toutes choses égales d'ailleurs, on détermine la quantité de matière passive hydrolysée en fonction du temps, on voit que la question est complexe. Elle a longtemps divisé les chimistes.

O. SULLIVAN et TOMPSON [23] dans leurs recherches sur l'invertine

admettent que, conformément aux lois générales de la mécanique, le rapport de la quantité de matière passive transformée au temps va en diminuant, conformément à la loi d'action de masse ; ou mieux, la vitesse à chaque instant est proportionnelle à la quantité de corps qui au moment considéré reste encore à transformer. C'est la loi logarithmique.

DUGLAUX [24] constate avec la même diastase que la quantité de matière transformée reste longtemps directement proportionnelle au temps. Il explique la diminution de vitesse qu'il constate en fin de réaction par l'action entravante des produits d'hydrolyse qui s'accroissent peu à peu.

H. VAN LAER [25] et H. COLIN et Mlle CHAUDUN, dans leurs recherches sur la sucrase disent que le phénomène est gouverné par le rapport entre la quantité de matière passive ou substrat et celle de la diastase. D'après leurs expériences, ce phénomène dépend, toutes choses égales d'ailleurs, uniquement de la concentration initiale en matière transformable. Pour une faible concentration, la réaction est du type moléculaire ; pour les concentrations plus fortes, elle est du type linéaire.

P. FLEURY, dans ses recherches sur la laccase (*loco citato*), envisage la question sous un autre aspect. Au lieu de considérer la variation de la vitesse au cours de la réaction, il ne s'occupe que de la vitesse initiale qu'il détermine, à ferment constant, pour diverses concentrations progressivement croissantes du substrat. Pour les faibles concentrations, cette vitesse initiale est proportionnelle à la concentration du substrat ; si on augmente cette concentration, il arrive à un moment où la proportionnalité s'atténue à tel point que la vitesse initiale devient indépendante de cette concentration. FLEURY, étant obligé de se tenir dans des limites de temps très courtes à cause de la grande altérabilité de la laccase, constate une bonne proportionnalité linéaire entre la quantité de matière transformée et la quantité de ferment, à condition de réaliser la constance de la composition du milieu par addition au ferment d'une certaine quantité de liquide fermentaire bouilli.

Le problème qui se pose pour nous n'est plus du même ordre. Nous nous sommes efforcé d'établir expérimentalement le temps nécessaire et suffisant pour évaluer la valeur protéolytique de nos diverses papaines. Nous avons cherché au bout de combien de temps la réaction était sensiblement limitée, c'est-à-dire à quel moment les matériaux de transformation s'opposaient d'une façon

Résultats opératoires.

Temps en heures	Déviatiou polarimétrique (1 = 2 d. c. m.)	Acides aminés Méthode SØRENSEN NaOH décimal	Extrait sec sur 10 cm ³ de liq. de digestion en milligrammes
cm ³			
1° Suc de Papayer (0,05).			
1 1/4	— 1°, 08'	0.55	0.107
1 1/2	— 1°, 56'	0.80	0.128
3 1/4	— 2°, 04'	0.95	0.149
1	— 2°, 10'	1.15	0.172
1 1/2	— 2°, 16'	1.35	0.209
2	— 2°, 30'	1.50	0.242
3	— 2°, 52'	2.05	0.261
4	— 3°, 14'	2.15	0.252
5	— 3°, 40'	2.2	0.253
6	— 3°, 46'	2.25	0.255
2° Papaïne précipitée par l'alcool (0,03).			
1 1/4	— 0°, 58'	0.35	0.083
1 1/2	— 1°, 24'	0.7	0.125
3 1/4	— 1°, 52'	1.1	0.168
1	— 2°, 08'	1.25	0.188
1 1/2	— 2°, 18'	1.4	0.213
2	— 2°, 32'	1.9	0.239
3	— 2°, 48'	2.15	0.248
4	— 2°, 52'	2.2	0.249
5	— 3°, 02'	2.25	0.250
6	— 3°, 08'	2.25	0.251
3° Papaïne de dialyse (0,02).			
1/4	— 1°, 12'	0.8	0.128
1/2	— 1°, 44'	1.15	0.180
3/4	— 2°, 08'	1.5	0.215
1	— 2°, 26'	1.8	0.228
1 1/2	— 2°, 38'	1.9	0.250
2	— 2°, 44'	1.95	0.259
3	— 2°, 56'	2.25	0.262
4	— 2°, 58'	2.30	0.265
5	— 3°, 06'	2.35	0.268
6	— 3°, 12'	2.40	0.271
4° Papaïne à l'alcool, dialysée (0,02).			
1/4	— 1°, 52'	0.65	0.122
1/2	— 2°, 02'	1.1	0.199
3/4	— 2°, 32'	1.45	0.237
1	— 2°, 48'	2.15	0.254
1 1/2	— 3°, 14'	2.2	0.259
2	— 3°, 32'	2.35	0.264
3	— 3°, 44'	2.55	0.273
4	— 3°, 56'	2.6	0.274
5	— 3°, 58'	2.65	0.275
6	— 4°, 02'	2.75	0.275

véritablement sensible à l'action du ferment dans des conditions bien déterminées.

Mode opératoire. — Nos opérations furent conduites chaque fois sur 3 échantillons de la même papaine. Nous utilisons désormais la fibrine comme matière passive, elle est plus facilement hydrolysable que la caséine.

Les autres facteurs demeurant les mêmes :

Fibrine.....	2 gr.,50
Eau bidistillée..	50 cm ³
Température.....	+ 70°

les quantités de ferment entrant en réaction furent les suivantes :

Suc de Papayer.....	0,05
Suc précipité par l'alcool.....	0,03
Suc dialysé.....	0,02
Suc dialysé et précipité par l'alcool.....	0,02

A l'examen de ces Tableaux, on constate que c'est pendant les 2 premières heures surtout que la protéolyse a la plus forte vitesse. A partir de ce moment, la marche se ralentit pour se stabiliser très sensiblement au bout de 8 heures et atteindre son optimum. Nos courbes montrent nettement que plus le ferment est pur, plus rapidement la vitesse limite est atteinte. Cependant, il ne faudrait pas en conclure que la digestion est complète dès que cette limite est atteinte. Ainsi, les papaines de dialyse ont déjà dissous une quantité très grande de fibrine, mais la touche azotique qui consiste à ajouter 20 gouttes d'acide azotique officinal à 10 cm³ de liquide de digestion et la méthode dite au formol de SOERENSEN nous donnent des renseignements très précieux sur l'état de désagrégation des matières protéiques et la quantité d'acides aminés formés (Voir tableau p. 31).

La touche azotique ne donne un résultat négatif qu'après trois heures de contact avec les bonnes sortes de papaine. C'est le phénomène de solubilisation brusque qui intervient ici et précède la dégradation de la matière protéique. La méthode de SOERENSEN confirme cette hypothèse et montre que l'enrichissement du liquide en acides aminés est appréciable jusqu'à 3 heures de contact.

		Touche azotique	Méthode de SOERENSEN
Après 1 h. de réaction	Suc brut de Papayer	Précipité très abondant	1,15
	Papaïne à l'alcool	id.	1,25
	Papaïne de dialyse	id.	1,80
	Papaïne à l'alcool dialysée.	id.	2,15
Après 2 h. de réaction	Suc brut de Papayer	Précipité	1,50
	Papaïne à l'alcool	id.	1,90
	Papaïne de dialyse	Opalescence	1,95
	Papaïne à l'alcool dialysée	id.	2,35
Après 3 h. de réaction	Suc brut de Papayer	Opalescence très légère	2,05
	Papaïne à l'alcool	Touche bonne	2,15
	Papaïne de dialyse	id.	2,25
	Papaïne à l'alcool dialysée	id.	2,55

Conclusion.— Il est absolument nécessaire que la durée de la protéolyse papainique soit de trois heures à $\pm 70^\circ$ pour pouvoir connaître, sans erreur appréciable, l'activité d'une papaïne. C'est la raison pour laquelle tous nos essais ont été faits pendant une durée de trois heures.

Influence de la réaction du milieu.

L'influence de la réaction du milieu sur l'activité d'une diastase est des plus importante. Très longtemps restée obscure parce qu'il n'y avait pas de méthode suffisamment sensible et précise pour la mesurer, elle n'a pris sa valeur réelle que le jour où la physico-chimie a permis de définir d'une façon précise l'acidité et l'alcalinité vraie d'un milieu en leur donnant comme base la mesure de sa concentration en ions H et en ions HO.

KJELDAHL, dès 1879, dans ses travaux sur l'invertine et sur l'amylase constate l'influence diverse de solutions équivalentes de divers acides.

FERNBACH, MAQUENNE, ROUX s'efforcent d'établir la réaction optima d'un milieu donné par rapport à certains indicateurs comme l'hélianthine.

La réaction optima du milieu au sein duquel doit se faire la protéolyse papainique fut souvent controversée.

WÜRTZ dit que la papaine agit en présence d'une légère acidité, mais aussi en milieu neutre ou même légèrement alcalin. Ce fut le point de départ de toute une série de recherches, les unes tendant à prouver que l'optimum était en milieu acide, les alcalis étant nuisibles ; les autres en milieu alcalin, les acides étant défavorables.

Parmi les partisans d'un milieu acide, il faut citer : HIRSCHLER [26], OSSWALD [27], J.-B. DOTT [28] et parmi les autres : MARTIN [29], FR. DAVIS [30], RIDEAL [31], UMMÉY [32].

D'autres, par contre, donnent l'alcalinité et l'acidité comme également nuisibles et placent l'activité optima de la papaine à la neutralité.

HIRSCH obtient les résultats les plus discordants en opérant à $+ 38^{\circ}$ avec des sortes commerciales. Avec une papaine purifiée, l'action optimum serait aussi bien en milieu légèrement alcalin qu'en milieu neutre. A la température où il effectue ses essais il est dans de telles conditions de température que ses résultats sont bien entachés d'erreurs.

En résumé, des faits bien contradictoires sont publiés: il paraît cependant en résulter que la zone d'activité doit être très voisine de la neutralité et ne pas déborder beaucoup, tant du côté de l'acidité que du côté de l'alcalinité. C'est le cas parfait d'une étude de la digestion papainique par rapport à la concentration en ions hydrogène du milieu au sein duquel a lieu la réaction. La détermination du pH d'un milieu protéolytique permet de voir avec beaucoup de précision l'influence d'une faible alcalinité ou d'une faible acidité sur l'activité optima d'une protéase.

Technique de la détermination du pH.

Les déterminations du pH ont été faites simultanément par la méthode colorimétrique de CLARK d'une part et par la méthode électrométrique d'autre part, au moyen de l'appareil à électrode au calomel de COGGESHALL (voir description : R. FABRE [33]). Ces deux méthodes nous ont donné des résultats très comparables.

Pour nos déterminations colorimétriques, nous avons opéré suivant la technique décrite en détail par Ch.-O. GUILLAUMIN [34],

c'est-à-dire au moyen de solutions tampons de pH connus et d'indicateurs colorés.

L'inconvénient de cette méthode est la trop facile altérabilité de ces solutions tampons. Nous avons obtenu de très bons résultats en les conservant sous toluène et dans des flacons enduits intérieurement de paraffine. Chaque flacon est muni d'un robinet de verre pour l'écoulement du liquide et bouché à la partie supérieure par une ampoule de verre remplie de chaux vive destinée à absorber CO_2 de l'air qui pénètre dans le flacon lorsqu'on ouvre le robinet. Avec ces précautions, nous avons conservé les solutions de phosphate disodique et de phosphate monopotassique plusieurs mois sans altération. En flacon non paraffiné, la solution acide se neutralise partiellement avec le temps par suite de l'alcalinité que lui cède le verre. Les vases en pyrex, eux-mêmes, modifient également au bout de quelque temps, l'équilibre ionique des solutions tampons.

Toutes nos déterminations et tous nos essais ont été faits avec de l'eau bi-distillée obtenue par redistillation de l'eau distillée du commerce sur du permanganate de potasse et de l'acide phosphorique officinal. L'appareil distillatoire employé comportait un ballon de grande capacité (10 litres pour 5 à 6 litres de liquide à rectifier) à la suite duquel étaient adaptés soit une colonne à plateaux, soit un appareil de DELATRE, suivis d'un réfrigérant de VIGREUX. Le ballon était chauffé au bain de sable de façon que la température fut à peu près constante, l'ébullition régulière et sans soubresauts. Il ne faut pas pousser la distillation au-delà d'une certaine limite sous peine de voir le distillat à nouveau souillé.

Les premiers essais de rectification que nous avons effectués en présence de permanganate et d'acide sulfurique ne furent pas satisfaisants, il y avait toujours des traces de SO_2 qui étaient entraînées, souillaient notre eau et lui donnaient finalement un pH variant de 3,5 à 4,2 suivant que la distillation avait été plus ou moins longue. L'acide phosphorique officinal ne nous a pas donné les mêmes inconvénients, il paraît de beaucoup préférable puisqu'il nous a permis d'obtenir d'une façon constante une eau dont le pH était de 6,87, c'est-à-dire très sensiblement neutre puisque la neutralité théorique est au $\text{pH} = 7$.

Toutes nos expériences ont donc été faites au moyen de cette eau de $\text{pH} = 6,87$.

Conditions expérimentales. — Nos déterminations colorimétriques et électrométriques ont été faites à la température du laboratoire entre $+ 15^{\circ}$ et $+ 19^{\circ}$. Elles ont toutes été ramenées par correction à la température uniforme de $+ 15^{\circ}$.

La première question qui se posait était de savoir quelle était l'action de la papaine sur le pH. Nous savons que la pepsine en solution aqueuse donne une réaction légèrement acide, il en est de même de la papaine du commerce qui contient des sels minéraux. Par contre, notre papaine alcoolique dialysée n'a plus aucune action sur la réaction du milieu. Ce fait semble montrer que nous sommes en présence d'une diastase qui n'est plus souillée par la présence d'aucune matière minérale soluble. C'était le but que nous nous étions proposé.

Pour obtenir des milieux de concentrations en ions H convenables nous avons utilisé le mélange de PO^4KH^2 et de $\text{PO}^4\text{Na}^3\text{H}$ préconisé par Ch.-O. GUILLAUMIN. Il permet d'obtenir une gamme comprise entre $\text{pH} = 5$ et $\text{pH} = 8,5$.

La solution de PO^4KH^2 est à 9 gr.,078 par litre $\frac{\text{M}}{15}$. Il importe que ce sel soit rigoureusement pur. Les moindres traces de chlorures ou de sulfates troubleraient son équilibre ionique.

La solution de $\text{PO}^4\text{Na}^3\text{H}$ recommandée par SOERENSEN contient 11 gr.,876 du sel $\text{PO}^4\text{Na}^3\text{H} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, soit également $\frac{\text{M}}{15}$. Celui-ci s'obtient facilement et SOERENSEN recommande de laisser à l'air pendant au moins 15 jours du sel à 12 molécules d'eau effleuré ou non.

C'est un moyen pratique pour obtenir un titre sûr de la solution en phosphate.

Il suffit de mélanger ces 2 solutions $\frac{\text{M}}{15}$ dans des proportions convenables et qui ont été déterminées une fois pour toutes pour avoir la gamme des valeurs intermédiaires entre $\text{pH} = 5$ et $\text{pH} = 8$.

Les indicateurs colorés sont les suivants :

Le rouge de méthyle	$\text{pH} = 5$ à 5,6
Le bromocresol pourpre.....	$\text{pH} = 5,7$ à 6,7
Le rouge de phénol	$\text{pH} = 6,9$ à 8,1
Le bleu de thymol.....	$\text{pH} = 8,2$ à 8,5

Les déterminations se font dans des tubes à essais de verre neutre de façon que ceux-ci ne cèdent rien au liquide soumis à l'examen colorimétrique.

Conditions d'expérience.

Papaïne précipitée par l'alcool et dialysée.....	0,02
Fibrine	2,50
Solution tampon de pH déterminé.....	50 cm ³

(Température + 7°)

Variation de la concentration du milieu en fonction du temps à pH variable.

pH initial	Cm ³ de solution de :		pH		Acides aminés Mét. SOERENSEN après 3 heures NaOH au dixième normal	Extrait sec de 10 cm ³ de liq. de dig. après 3 heures
	PO ⁴ KH ² au quinzième normal	PO ⁴ Na ² H au quinzième normal	Après 1 heure de digestion	Après 3 heures de digestion		
5	49,25	0,75	4,7	4,4	1,3	0,159
5,5	47,75	2,25	5,1	4,8	1,5	0,209
6	43,75	6,25	5,3	5,1	1,9	0,238
6,5	34,0	16,0	5,5	5,3	2,2	0,252
7	18,50	31,50	5,8	5,5	2,4	0,268
7,5	7,90	42,1	6,5	6,2	2,1	0,247
8	2,80	47,2	7,5	7,3	1,7	0,216
8,5	0,75	49,25	8,5	8,2	1,2	0,142

Interprétation. — Les faits établissent que la quantité d'extrait sec de 10 cm³ de liquide de digestion de 3 heures, abstraction faite naturellement des sels minéraux qui interviennent comme tampons, croit toutes choses égales d'ailleurs en allant du pH = 5 au pH = 7, c'est-à-dire au fur et à mesure que diminue l'acidité du milieu. Elle devient maxima au pH = 7, c'est-à-dire à la neutralité du liquide. Inversement, elle décroît lorsque le milieu passe de la neutralité à l'alcalinité pour devenir minimum au pH = 8,5. La quantité d'acides aminés formés au cours de la protéolyse, évaluée par la méthode de SOERENSEN suit également la même marche ascendante du pH = 5 au pH = 7 et devient décroissante du pH = 7 au pH = 5.

Conclusion. — La méthode physico-chimique qui nous permet de déterminer avec beaucoup de précision l'acidité ou l'alcalinité vraie d'un milieu de réaction par la mesure de sa concentration en ions hydrogène et d'en faire varier facilement cette concentration nous permet de trancher le différent qui existe entre les biologistes à savoir si la papaïne a son optimum d'action en milieu acide, alcalin ou neutre. C'est en milieu neutre pH = 7 que l'action de la papaïne est optima. L'acidité ou l'alcalinité même faibles retardent sa protéolyse.

IV. — Essais des sucres commerciaux.

L'influence du temps de la digestion, de la quantité de ferment par rapport à la matière passive, de la réaction du milieu nous paraissent suffisamment établis pour nous permettre d'évaluer l'activité des sucres de Papayer que l'on trouve actuellement sur nos marchés.

Nous avons analysé quatre sucres d'origine différentes :

Suc N° 1. — Sorte en très petites larmes d'aspect vermiculé, couleur jaune paille, odeur faible particulière, saveur très légèrement salée. Soluble incomplètement dans 20 parties d'eau même en chauffant légèrement, la liqueur surnageante est à peine colorée.

Suc N° 2. — Larmes à peu près de la même grosseur que les précédentes, couleur brun jaunâtre, odeur forte, aromatique, rappelant celle de la pepsine. Nombreuses impuretés. Soluble incomplètement dans 20 parties d'eau. La solution est légèrement ambrée.

Suc N° 3. — Larmes de grosseur très différentes, les unes petites d'aspect vermiculé, les autres en petites masses irrégulières de la grosseur d'une noisette, couleur brun foncé, odeur forte, vireuse, légèrement nauséuse. Soluble incomplètement dans 20 parties d'eau; la liqueur surnageante est ambrée.

Suc N° 4. — Larmes de formes très irrégulières, les unes petites et vermiculées, les autres de la grosseur d'un pois. Les larmes vermiculées sont plus claires. Il semble que l'on soit en présence d'un mélange de larmes se rapprochant de celles du suc N° 1, avec des larmes de qualité très inférieure ayant subi un commencement de putréfaction. Très peu soluble dans 20 parties d'eau. La liqueur surnageante est brun clair à odeur forte désagréable.

En résumé, nous nous permettons d'indiquer les constantes

physiques et chimiques qu'il est nécessaire d'exiger pour les sortes commerciales de papaine utilisées en thérapeutique. Nous espérons que nos suggestions retiendront l'attention de la Commission du Codex qui pourrait s'inspirer de nos propositions pour faire figurer à la Pharmacopée le suc de Papayer, la papaine purifiée et l'essai protéolytique de ce produit.

Suc de Papayer. — Latex épaissi obtenu par incision des fruits du *Carica Papaya* (L. Papayacées).

Le suc de Papayer est en larmes vermiculées ou en petites masses dures déformées par la rétraction du caillot au moment de sa coagulation. Au microscope, un fragment délayé dans une solution d'hydrate de chloral montre une multitude de globules de latex agglomérés, d'apparence granuleuse, de couleur brun foncé.

Il présente une odeur aromatique rappelant celle de la pepsine, parfois légèrement vireuse, saveur de pain grillé légèrement salée.

Desséché à $+ 100^{\circ}$ ne doit pas contenir plus de 25 p. 100 d'eau et donner plus de 10 p. 100 de cendres. Il est incomplètement soluble dans 10 vol. d'eau.

Essai protéolytique :

Suc de Papayer.....	0,10
Fibrine de porc.....	2,50
Eau bidistillée.....	50

Digestion de 4 heures à une température de $+ 70^{\circ}$ en agitant fréquemment pendant les 2 premières heures. Filtrer, 10 cm³ de la liqueur obtenue ne doivent pas se troubler à la température ordinaire par l'addition de 20 gouttes d'acide azotique officinal.

La déviation polarimétrique lue dans un tube de 2 dm. à $+ 15^{\circ}$ ne doit pas être inférieure à $- 3^{\circ}30'$ et voisine de $- 4^{\circ}00'$.

L'extrait sec obtenu à $+ 100^{\circ}$ pendant 6 heures sur 10 cm³ de liqueur doit être compris entre 235 mgr. et 265 mgr. (voisine de 250).

Essai. — Délayer un peu de poudre avec 1 ou 11 gouttes d'eau iodée et porter sous le microscope. La masse ne doit pas se colorer en bleu (amidon, pain grillé).

Papaine. — La papaine est une sorte d'extrait aqueux de suc de Papayer, préparé à froid, que l'on a précipité par 5 volumes d'alcool à 95° , lavé à l'éther anhydre et desséché à la température ordinaire dans le vide sulfurique.

Caractères. — Poudre blanche légèrement grisâtre, soluble dans 10 vol. d'eau sans résidu et dans l'alcool faible.

Insoluble dans l'alcool à 95°, l'éther et le chloroforme. Son action sur les matières protéiques s'exerce en milieu neutre ($\text{pH} = 7$), elle les dissout en les transformant en peptones et en acides aminés.

Essai. — La papaine doit répondre à l'essai du suc de Papayer à la dose de 0,05.

Conclusions.

De notre travail, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1^o La papaïne qui vient sur nos marchés n'est autre que le suc brut du *Carica Papaya*. Ce suc est très impur et d'activité protéolytique fort variable suivant les échantillons.

2^o Pour l'essai du pouvoir protéolytique de la papaïne, les expériences nous ont prouvé que la fibrine de porc desséchée est une *matière passive* préférable à la caséine ou à l'édésine cristallisée ; sa molécule est plus facilement attaquable par le ferment.

3^o Dans notre étude de la purification des sucs de Papayer afin d'obtenir des papaines actives, nous avons décrit trois méthodes différentes :

a) Précipitation de la papaïne de sa solution aqueuse par l'alcool fort.

b) Dialyse de la papaïne en solution aqueuse.

c) Précipitation de la papaïne de sa solution aqueuse par l'alcool fort, redissolution dans l'eau du précipité, dialyse et reprecipitation du ferment par l'alcool.

Cette dernière méthode permet d'obtenir des papaines très pures et de très grande activité. Pour l'usage pharmaceutique, la simple précipitation alcoolique donne un ferment d'activité bien suffisante et toujours comparable.

3^o La détermination de l'activité protéolytique nous a permis d'étudier l'influence de certains facteurs, à savoir la température, la concentration en diastase, la réaction du milieu, etc... Pour évaluer le degré de la protéolyse, nous avons chaque fois déterminé dans le liquide de digestion :

a) La quantité de substances solubilisées en déterminant l'extrait sec de 10 cm³ de liquide de digestion.

b) La déviation polarimétrique de ce liquide.

c) La quantité d'acides aminés formés aux dépens de la matière protéique passive par la méthode de SOERENSEN.

Ces méthodes nous ont donné des résultats très comparables.

Il en résulte que :

La température optima de la digestion papainique est très haute et assez voisine de la température de destruction du ferment : + 70° avec la fibrine et l'édestine comme matière passive + 90° avec la caséine.

Le temps optimum est de 3 heures au-delà duquel le milieu ne s'enrichit plus sensiblement en matériaux d'hydrolyse.

La concentration en diastase, lorsque l'on emploie 2,50 de fibrine sèche pour 50 cm³ de liqueur de digestion doit être de 0 gr., 10 de suc de Papayer ou de 0 gr., 05 de papaine précipitée par l'alcool.

La protéolyse est optima en milieu neutre pH = 7. Une légère acidité ou une faible alcalinité retardent la protéolyse.

Enfin, dans notre dernière partie de l'étude des sucs de Papayer et des papaines purifiées, nous avons pu fixer les constantes physiques et chimiques que l'on est en droit d'exiger des produits qui viennent sur nos marchés. Nous avons pensé qu'il pourrait être utile aux praticiens d'inscrire au Codex le suc brut de Papayer et la papaine purifiée par précipitation alcoolique avec leurs essais. La purification du suc peut être faite à l'officine, le seul point délicat étant la dessiccation de la drogue.

Vu et approuvé :

Le Président de Thèse,
GUERBET.

Le Doyen de la Faculté,
RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
APPEL.

BIBLIOGRAPHIE.

1. DAVID, S. PRATT.— The Philippine, *Journ. of Sc.*, X, A, I (1915).
2. VAUQUELIN.— Examen chimique du suc de Papayer *Ann. Chim.*, XVIII, 267 (1802).
3. WITTMACK.— *Ph. J. Trans.* (3), IX, 449 (1878).
4. PECKOLT.— *Ph. J. Trans.* (3), X, 343-383 (1879).
5. WURTZ et BOUCHUT. — Sur le ferment digestif du C. Papaya, *C. R. Ac. Sc.*, XXXIX, 425 (1879) ; *C. R. Ac. Sc.*, XC, 1379 (1880) ; *C. R. Ac. Sc.*, XCI, 787 (1880).
6. BOUCHUT. — *C. R. Ac. Sc.*, XC, 617 (1880) ; *C. R. Ac. Sc.*, XCI, 1843 (1881).
7. CHOAY. — Thèse Doct. Ph., Paris, 98-99 (1911).
8. FLEURY et LEVALTIER.— *Journ. Pharm. et Ch.* (7), p. 137, XXIX.
9. THOMAS B. OSBORNE.— The vegetable Proteins.
10. R.-H.-A. PLÜMMER. — *Practical org. and Bio. Chim.*, 451 (1918).
11. H. MOUTON et POZERAKI. — *C. R. Soc. Biol.*, 86-87 (1908).
12. EMMERLING. — *Zeitschr. f. physiol. Chim.*, XLIV, 382 (1905).
13. KUTSCHER et LOHMANN.— *Zeitschr. f. Physiol. Chim.*, XLIV, 383 (1905).
14. S. P. L. SØRENSEN.— Meddelelser fra Carlsberg Laboratric, 1 (7), 1 (1907).
15. RIDEAL.— *Pharm. J.*, XXV, 183 (1894).
16. ROSSBACH.— *Qitschef. f. Klin. Med.*, VI, 527 (1863).
17. S. MARTIN.— Papaine digest., *J. of Physiol.*, V, 220 (1884).
18. WITTMACK.— *Ph. J. Trans.*, (3), IX, 449 (1878).
19. DELEZENNE, H. MOUTON et POZERSKI. — *C. R. Biol.*, LX, 68 (1906) ; *C. R. Biol.*, LX, 309 (1906) ; *C. R. Biol.*, LXIV, 1105 (1908) ; Thèse Doct. Sc., Paris, 1908.
20. J. KJEHLDAHL. — *C. R. Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet*, Trad. française, Tome I, pages 111, 153, 157 (1878).
21. H. COLIN et Mlle A. CHAUDUN. — Sur la loi d'action de la sucrase, *C. R. Ac. Sc.*, 174, 218 (1922) CLXXIV et COLIN : Thèse Doct. Sc. Phys., Paris (1920).
22. P. FLEURY. — Thèse Doct. Sc. nat., Paris, 44 (1924).
23. O'SULLIVAN et TOMPSON. — *Journ. Chim. Soc.*, LVII, 844-931 (1890).

24. DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, I, 146, 1899, Masson, Edit., Paris.
 25. H. VAN LAER. — *Bull. Sc. Acad. Roy. Belg.*, XIII, 367-370 (1911).
 26. HIRSCHLER. — *Ungr. Arch. of Médic.*, I, 341 (1892).
 27. K. OSSWALD. — *Munch. Med. Wæheschr.*, XXXIV, 665 (1894).
 28. J.-B. DOTT. — *Ph. J. Trans.* (4), II, 184 (1896).
 29. MARTIN. — *Papaïn digest.*, *J. of Physiol.*, V, 220 (1884).
 30. FR. DAVIS. — *The physiol. J.*, V, 220 (1893).
 31. RIDEAL. — *Physiol. J.*, XXV, 183 (1894).
 32. UMNEY. — *Bull. oyal Gartens Keiv* (1897).
 33. R. FABRE. — *Journ. Pharm. et Chim.*, (7), XXV, 28-32 (1922).
 34. CH.-O. GUILLAUMIN. — *Journ. Pharm. et Chim.*, (7), XXV, 173 (1922).
-

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
HISTORIQUE	1
I. Les matières passivés.....	6
Préparation de la Fibrine de porc (globuline).....	6
Caséine (lactoprotéide).....	7
Edestine (globuline cristallisée).....	8
II. Préparation et choix d'une papaïne active.....	10
Sucs de Papayer ou papaïnes brutes.....	18
Suc de Papayer purifié par simple précipitation alcoolique	12
Suc de Papayer purifié par dialyse, puis précipité par l'alcool.....	13
Papaïne précipitée par l'alcool dialysée, puis reprecipitée par l'alcool.	14
III. Mesure de l'activité proteolytique.....	16
Détermination de la température optima.....	20
Influence de la quantité de ferment.....	23
Variation d'activité en fonction du temps pour diverses quantités de papaïne.....	25
Matières transformées en fonction du temps. Temps optimum.....	27
Influence de la réaction du milieu.....	31
Technique de la détermination du pH.....	32
IV. Essai des sucs commerciaux et conclusions.....	36
BIBLIOGRAPHIE.....	41

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER
